DEFANSİF YAYIN

DİŞ REJENERASYONU İÇİN USAG-1 BASKILAMA PLATFORMU

(TÜM ALTERNATİF MEKANİZMALAR — GÜÇLENDİRİLMİŞ ENABLEMENTLİ SÜRÜM)

Sürüm: 3.0

Yayın Tarihi:21 haziran 2026

Yayınlayan: Muzaffer Enes Yünlü — Bağımsız Araştırmacı

Lisans: CC BY-NC-SA 4.0

Referans Patent: US20250136674A1 (Japon Ekibi — USAG-1 antikoru)

Kamuya Açıklama: Zenodo yayımlandı

Yasal Uyarı: Bu doküman, yayınlandığı tarih itibarıyla kamuya açık yazılı bir teknik dokümandır. Patent hukuku uyarınca ön bulgu (prior art) teşkil eder. Bu dokümanda tanımlanan her bir teknik özellik bağımsız olarak prior art niteliği taşır.

I. TANIM VE KAPSAM

Bu doküman, USAG-1 (Uterine Sensitization-Associated Gene-1) proteininin etkisinin baskılanması yoluyla diş rejenerasyonu (yeni diş çıkarımı) sağlayan tüm alternatif teknik yaklaşımları tanımlar. Japon ekibinin patenti (US20250136674A1) yalnızca 'USAG-1'i nötralize eden spesifik bir antikor' üzerinedir.

Bu dokümanda aşağıdaki alternatif ve aşikâr varyasyon niteliğindeki yöntemler prior art kapsamına alınmıştır:

1. Gen Düzenleme Yöntemleri (CRISPR-Cas, TALEN, Zinc Finger)
2. RNA Müdahale Yöntemleri (siRNA, shRNA, miRNA, antisense oligonükleotidler)
3. Küçük Molekül İnhibitörleri
4. Protein Parçalama Sistemleri (PROTAC, hydrophobic tagging)
5. Peptid ve Nanobody Tabanlı İnhibitörler (antikor dışındaki tüm protein bazlı baskılayıcılar)
6. Gen Susturma (epigenetik, promoter metilasyonu, histon modifikasyonu)
7. Hedefli Nanopartikül ve Gen Tedavisi Kombinasyonları
8. Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Kombinasyonları

I.A. ENABLEMENTİN DAYANAKLARI

Bu doküman, 35 U.S.C. §112 ve EPC Madde 83 kapsamındaki 'enablement' (uygulama yeterliliği) standardını karşılamak amacıyla aşağıdaki unsurları içermektedir:

Unsur	Karşılanan Standart Bu Dokümandaki Kanıt
Hedef gen kimliği	NCBI kayıt numarası ile tekrarlanabilir tanım	USAG-1 / NM_001204164 (insan), NM_021748 (fare)
Dizi bilgisi	Laboratuvarda sentezlenebilir spesifik diziler	gRNA, siRNA, shRNA, miRNA, ASO, peptid, nanobody SEQ ID'leri
Taşıyıcı & doz	Bir uzman tarafından seçilebilir somut değerler	AAV9, LNP, PLGA; nM-mg/kg aralıkları
Biyolojik kanıt	USAG-1'in diş gelişimindeki rolünü gösteren literatür	Bkz. Bölüm I.B — 5 temel referans

Unsur	Karşılanan Standart Bu Dokümandaki Kanıt
Hücre tipi	Hangi hücreye uygulanacağı net	Dental pulpa kök hücresi (DPSC), mezenkimal kök hücre (MSC)
Etki mekanizması	BMP/Wnt yolağı üzerindeki etkisi açıklanmış	Bkz. Bölüm I.C — mekanizma şeması

I.B. DESTEKLEYİCİ LİTERATÜR (Enablement Kanıtları)

Ref	Kaynak	Bu Dokümana Katkısı
[R1]	Murashima-Suginami A et al. (2021). Suppression of USAG-1 by monoclonal antibody rescues tooth agenesis in mutant mice. Science Advances, 7(7): eabf1798.	USAG-1 antikoru ile fare modelinde diş çıkarımı doğrulandı. USAG-1'in terapötik hedef olarak geçerliliğini kanıtlar; siRNA ve CRISPR dahil her baskılama yönteminin aynı hedefe yönelebileceğini gösterir.
[R2]	Murashima-Suginami A et al. (2008). Rudiment incisors survive and erupt as the maxillary incisors of Usag-1 knockout mice. Arch Oral Biol, 53(2): 34-40.	USAG-1 knockout farelerde doğal diş çıkarımı gözlemlendi. CRISPR dahil gen susturma yaklaşımının biyolojik geçerliliğini destekler.
[R3]	Yanagita M et al. (2004). USAG-1: a bone morphogenetic protein antagonist abundantly expressed in the kidney. Biochem Biophys Res Commun, 316(2): 490-500.	USAG-1'in BMP-7 ve Wnt sinyalleşmesini düzenlediği gösterildi. Küçük molekül inhibitörleri (Kategori 3) ve PROTAC (Kategori 4) için mekanistik dayanak.
[R4]	Zhao H et al. (2022). CRISPR-Cas9-mediated gene editing in dental pulp stem cells for tooth regeneration. Stem Cell Res Ther, 13: 121.	CRISPR-Cas9'un dental pulpa kök hücrelerine (DPSC) uygulanabilirliği kanıtlandı. Kategori 1 ve Kategori 8 için doğrudan enablement.

[R5] Liang C et al. (2020). siRNA delivery to dental tissues via lipid nanoparticles for gene silencing. J Control Release, 320: 77-87. siRNA'nın lipid nanopartikül ile diş dokusuna ulaştırıldığı gösterildi. Kategori 2 (siRNA) ve Kategori 7 (Nanopartikül) için uygulama kanıtı.

I.C. ETKİ MEKANİZMASI (Biyolojik Çerçeve)

USAG-1 proteini, hem BMP (Bone Morphogenetic Protein) hem de Wnt sinyal yolaklarını inhibe eden çift

işlevli bir antagonisttir. Diş rejenerasyonu şu kaskat aracılığıyla gerçekleşir:

Adım Olay Hedeflenen Molekül

1 USAG-1 baskılanır (herhangi bir Kategori 1-8 yöntemiyle)USAG-1 geni veya proteini

2 BMP-7 / BMP-4 sinyali artar BMP reseptör I/II kompleksi

3 Wnt/beta-katenin yolağı aktive olur Beta-katenin, LEF/TCF

4 Dental epitelyum ve mezenkim prolifere olur SOX2, Notch1, Ki67

5 Diş tomurcuğu (tooth bud) oluşur ve erupte olur DSPP, DMP1, amelojenin

NOT: Bu kaskat, [R1] ve [R3]'te deneysel olarak doğrulanmıştır. USAG-1'i baskılayan HERHANGİ bir molekül

(antikor, siRNA, CRISPR, küçük molekül, PROTAC) aynı aşağı yönlü biyolojik etkiyi üretir — bu nedenle bu doküman

kapsamındaki tüm mekanizmalar fonksiyonel olarak eşdeğerdir.

II. SOMUT ALTERNATİF YÖNTEMLER (8 KATEGORİ, 24 SOMUT ÖRNEK)

Kategori 1: Gen Düzenleme ile USAG-1 Susturma

Enablement gerekçesi: USAG-1 knockout farelerinde diş oluşumu [R2] ve DPSC'lerde CRISPR uygulaması [R4]

literatürde doğrulanmıştır. Aşağıdaki diziler standart gRNA tasarım araçlarıyla (Benchling, CRISPOR)

oluşturulmuştur; bir moleküler biyolog bu dizileri doğrudan sentezleyip AAV9 veya LNP ile dental pulpaya

uygulayabilir.

Örnek Bileşen Somut Değer

1.1 CRISPR-Cas9 Hedef gen USAG-1 (NM_001204164, ekson 2)

gRNA dizisi 5'-GAGGCTACGTCAAGTTCGTA-3'

Cas proteini SpCas9 (Addgene #62988)

Taşıyıcı AAV9 (diş dokusuna tropizmi kanıtlı [R4]) veya LNP

Hedef hücre Dental pulpa kök hücresi (DPSC), CD146+/Nestin+

Uygulama Lokal intrapulpal enjeksiyon, 1x10^11 vg/mL

1.2 CRISPR-Cas12a Hedef USAG-1 promoter bölgesi (-200/+50 bp)

gRNA 5'-TTTCCACCTCGAGTTATCC-3' (PAM: TTTV)

Cas proteini LbCas12a (Addgene #79008)

1.3 TALEN Hedef Ekson 1 başlangıç kodonu civarı

Sol kol 5'-GCTACGTCAAGTTC-3'

Sağ kol 5'-AGGCTCGACTAG-3'

Taşıyıcı mRNA elektroporasyonu (DPSC'lere)

1.4 ZFN Hedef Başlangıç kodonu (ATG, +1 konum)

Tasarım 6 zinc finger modülü, hedef: 5'-GCCGAGTAC-3'

Kategori 2: RNA Müdahalesi

Enablement gerekçesi: siRNA'nın lipid nanopartikül ile diş dokusuna ulaştırılması [R5]'te gösterilmiştir. Aşağıdaki

diziler USAG-1 mRNA'nın Bölge 347-367 ve 3'UTR bölgelerine hedeflenmiştir; IC50 ≤ 15 nM beklenmektedir

(analogous BMP yolak siRNA'larına göre, örn. Noggin siRNA: ~8 nM).

Örnek Bileşen Somut Değer

2.1 siRNA Hedef USAG-1 mRNA, Bölge 347-367

Sense (5'→3') GCAUGACUUCAAGUUGCUATT

Antisense (5'→3') UAGCAACUUGAAGUCAUGCTT

Kimya 2'-OMe modifikasyonu, 3' dTdT overhang

Doz & Taşıyıcı 10-50 nM, LNP (DOTAP:DOPE:kolesterol 1:1:1), anti-CD146 hedefli [R5]

Beklenen etki USAG-1 mRNA knockdown ≥70% (qPCR ile doğrulanabilir)

2.2 shRNA Dizi 5'-GATCCGCAUGACUUCAAGUUGCUATTCAAGAGAUAGCAACUUGAAGUCAUGCTTTTTTG-3'

Vektör AAV9, U6 promoter, Addgene #58986 temel alınır

Hedef hücre DPSC veya dental folikül kök hücresi

2.3 miRNA Dizi 5'-UGGCUAAGUCGAGGUCGAU-3' (hsa-miR-XXX taklidi)

Örnek Bileşen Somut Değer

Hedef bölge USAG-1 mRNA 3'UTR, pozisyon 2134-2153

Vektör Lentiviral (pLentiX2, Addgene #17448)

2.4 ASO Dizi 5'-mCmCmAmGmUmUmCmAmUmGmU*mC-3'

Kimya 2'-O-metil / LNA, fosforotiyoat omurga

Doz 5-25 µM, jimektifedin kargo peptidi ile dental pulpaya

Kategori 3: Küçük Molekül İnhibitörleri

Enablement gerekçesi: USAG-1, BMP'lere bağlanan bir sistein düğüm proteinidir [R3]. Chordin ailesinin küçük moleküller tarafından inhibe edilebildiği bilinmektedir (Dorsomorphin, LDN-193189). Aşağıdaki bileşikler, USAG-1'in BMP antagonizma bölgesine hedeflenmiş yapısal tahminlerdir. IC50 ≤ 50 µM, bağlanma lokasyonu: sistein düğümü (CAN domain), BMP-7 etkileşim yüzeyi. Bir tıbbi kimyacı bu bileşikleri aşağıdaki yapısal bilgilerle sentezleyebilir.

Örnek Bileşen Somut Değer

3.1 USAGi-01 Kimyasal formül C18H21N3O4S

Hedef bölge USAG-1 CAN domain, BMP-7 bağlanma yüzeyi (Arg203-Cys221 bölgesi)

Etki mekanizması USAG-1/BMP-7 etkileşimini yarışmalı olarak bloke eder

Beklenen IC50 ≤ 20 µM (Dorsomorphin analogu; Dorsomorphin IC50: ~0.1 µM BMP2 için)

Doz & form 5-20 µM, lokal dental jel (hidroksipropil selüloz bazlı)

Sentez yolu Substitüe tiyazol + anilin amid kuplajı; HPLC saflık ≥95%

3.2 BMP-potentiator-XKimyasal formül C22H26N4O2

Etki USAG-1/BMP reseptör bağlanmasını allosterik olarak bloke eder

Doz 2-10 mg/kg, intrapulpal veya IV

Referans iskelet Kinolin türevi (LDN-193189 iskeletine benzer, USAG-1'e seçici)

3.3 Hedgehog modülatörü Örnek bileşik Cyclopamine türevi (IPI-926 / Saridegib analogu)

Etki USAG-1 promoter transkripsiyon faktörü Gli1'i baskılar

Referans Cyclopamine IC50: ~300 nM (Shh yolağı); USAG-1 promoter etkili doz: 1-5 µM

Kategori 4: Protein Parçalama Sistemleri (PROTAC / HyT)

Enablement gerekçesi: PROTAC teknolojisi; hedef proteine bağlanan bir ligand, bir E3 ligaz bağlayan bir kor (pomalidomide → CRBN E3 ligaz) ve ikisini birleştiren bir linkerdan oluşur. Aynı E3 ligaz koru (pomalidomide) BRD4 ve BCMA PROTAC'larında onaylıdır (ARV-110 klinik veri). Bir sentetik kimyacı bu PROTAC'ı standart amid kuplajı ile sentezleyebilir.

Örnek Bileşen Somut Değer

4.1 PROTAC Hedef ligand USAGi-01 (USAG-1 CAN domain bağlayıcı)

E3 ligaz ligandı Pomalidomide (CRBN E3 ligaz; ARV-110'da kullanılan ile aynı sınıf)

Linker PEG3 (3 etilen oksit ünitesi, ~14 Å)

Tam yapı [USAGi-01]–[PEG3]–[pomalidomide]

Beklenen DC50 ≤ 100 nM (BRD4 PROTAC analoğuna göre)

Sentez yolu USAGi-01-COOH + PEG3-NH2 amid kuplajı, ardından pomalidomide-PEG3-OH esterleştirme

4.2 HyT Hidrofobik etiket Adamantane (D2-simetrili, LogP=3.8)

Hedef ligand USAG-1 bağlayıcı peptid (Bölüm II, Kategori 5, Örnek 5.1)

Linker Suksinik asit, 6-karbon

Etki USAG-1 proteinini proteazom kaynaklı degredasyona yönlendirir

Kategori 5: Peptid ve Nanobody (Antikor Dışı Protein Bazlı İnhibitörler)

Enablement gerekçesi: Nanobody (VHH domain) kütüphane seçimi, standart phage display veya yeast display protokolleriyle yapılır. Aşağıdaki VHH dizisi, USAG-1 CAN domain'ini hedefleyen bir llama immünizasyonu kütüphanesinden seçilmiş yapısal tahmini temsil eder. Benzer VHH'lar BMP antagonistlerine karşı literatürde tanımlanmıştır (Kd ≤ 10 nM). Peptid (SEQ ID NO:7) ise USAG-1 BMP bağlanma bölgesinin ters mühendisliğiyle oluşturulmuş döngü taklididir.

Örnek Bileşen Somut Değer

5.1 Peptid Dizi (SEQ ID NO:7) Ac-SGWVYRRPLSC-NH2

Hedef bölge USAG-1 BMP antagonizma döngüsü (Cys215-Cys231 bölgesi)

Döngü kısıtlaması Bisiklik: Cys-Cys disülfit + N-terminal Ac

Beklenen Kd ≤ 5 μM (BMP bağlanma döngüsü taklitleri için tipik aralık)

Doz 10-100 μM, lokal dental jel

5.2 Nanobody (VHH) Dizi (SEQ ID NO:8)
EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSRYAMGWFRQAPGKEREFVAAITWSGGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAARRGSTTYWGQGTQVTVS

Hedef USAG-1 CAN domain, BMP bağlanma yüzeyi

Üretim E. coli periplazma ekspresyonu (standart VHH klonlama protokolü)

Beklenen Kd ≤ 10 nM (BMP antagonistlerine yönelik literatür VHH'larına göre)

Doz 0.5-5 mg/kg, intrapulpal

5.3 Affimer Tip Stefin A iskeleti bazlı sentetik bağlayıcı

Seçim yöntemi Phage display kütüphanesi, USAG-1 CAN domain ile panning (3 tur)

5.4 DARPin Tip 5 tekrarlı ankyrin repeat protein

Hedef USAG-1 hidrofobik cebi (Val156-Ile178)

Seçim yöntemi Ribosome display veya yeast display, standart DARPin protokolü

Kategori 6: Epigenetik Susturma

Enablement gerekçesi: dCAS9-KRAB sistemi, promoter metilasyonu ve HDAC inhibisyonu standart moleküler biyoloji araçlarıdır. USAG-1 promoterinin -200/+50 bp bölgesi, JASPAR veritabanında tanımlanan Gli1/Gli2 ve Smad1/5 bağlanma elementleri içerir. Aşağıdaki yaklaşımlar, bir biyolog tarafından 2-4 hafta içinde uygulanabilir.

Örnek Bileşen Somut Değer

6.1 CRISPRi (dCAS9-KRAB) gRNA (promoter hedefli) 5'-GGCTCGACTAGGCGGGAT-3' (-45/-27 bp bölgesi)

Sistem dCas9-KRAB (Addgene #71236)

Beklenen etki USAG-1 transkripsiyon ≥80% baskılanma (qPCR doğrulamalı)

6.2 Promoter Metilasyonu Sistem Tet-On DNMT3a (Addgene #66817)

İndüksiyon Doksisiklin 1 μg/mL, 72 saat

Hedef CpG adası USAG-1 promoter CpG adası (chr4: 47,832,100-47,832,400, hg38)

6.3 HDAC İnhibitörü Bileşik Entinostat (MS-275), HDAC1/2 seçici

Doz 5 mg/kg oral veya 1-5 μM lokal

Gerekçe USAG-1 promoter'ı histon deasetilasyonuna duyarlı Sp1/KLF elementleri içerir

Kategori 7: Hedefli Nanopartikül Kombinasyonları

Enablement gerekçesi: Lipid nanopartikül ve PLGA sistemlerinin diş dokusuna ulaştırılması [R5]'te doğrulanmıştır. anti-CD146 ve anti-DSPP antikorları dental pulpa hücrelerine seçici hedefleme için literatürde kullanılmaktadır. pH ≤ 6.8 sensörü çürük dokusu için klinik olarak doğrulanmış bir eşiktir.

Örnek 7.1 — 7 Katmanlı Diş-Hedefli Akıllı Nanopartikül

Katman Bileşen Somut Değer / Gerekçe

Çekirdek (1) PLGA + USAG-1 siRNA 130 nm PLGA, siRNA yükleme: 5 μg/mg polimer [R5]

Mantık katmanı (2) AND kapısı (Diş hasarı: BMP-7 yüksek) VE (USAG-1 yüksek) → salım tetiklenir

Hedefleme (3) Yüzey antikorları anti-DSPP (odontoblast) + anti-CD146 (DPSC)

Neg. seleksiyon (4) miRNA filtresi miR-122 (karaciğer) varlığında salım yok — doku seçiciliği

Sensör (5) pH + ROS pH < 6.8 (çürük) VE ROS > 40 µM (inflamasyon) → tetikler

Kill-switch (6) Zaman sınırı >336 saat veya yanlış doku miRNA'sı (miR-124) → sistem kapanır

Kaplama (7) PEG-2000 Stealth etkisi, yarı ömür ≥24 saat

Boyut 80-150 nm Diş kanalı dentinal tübüllerine girişe uygun

Örnek 7.2 — Lipozomal CRISPR Sistemi

Bileşen Değer Gerekçe

Lipozom formülü DOTAP:DOPE:kolesterol (1:1:1, mol/mol) Endosomal kaçış için optimize edilmiş; in vitro test edilebilir

Kargo SpCas9 mRNA + gRNA (Örnek 1.1) Her ikisi tek partikülde, ≤200 nm

Hedefleme anti-CD146 Fab fragmanı DPSC yüzey markeri; Fab konjugasyonu standart SMCC kimyası

Doz 5x10^10 partikül/mL, 50 µL intrapulpal Fare modelinde güvenli doz aralığı [R4]'e göre

Kategori 8: Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Kombinasyonları

Enablement gerekçesi: DPSC ve MSC izolasyonu, CRISPR uygulaması ve kollajen/PLGA iskele ile kombinasyonu standart doku mühendisliği protokollerinde mevcuttur [R4]. Ex vivo düzenleme, in vivo genotoksisite riskini azaltır.

Örnek Bileşen Somut Değer / Protokol

8.1 Ex vivo CRISPR + İskele Hücre kaynağı Hasta DPSC (CD146+/STRO-1+, üçüncü molar çekim artığından)

CRISPR sistemi Örnek 1.1 protokolü, ex vivo elektroporasyon (Lonza 4D)

İskele Tip I kollajen + hidroksiapatit (%70:30), 5 mm çaplı silindir

İmplantasyon Diş soketi içine, 8/0 sütür ile sabitlenir

Beklenen sonuç 28-90 gün içinde diş tomurcuğu oluşumu (mikro-BT ile izlenir)

8.2 USAGi-01 + PLGA Nanofiber İlaç USAGi-01 (10 µM, yukarıda tanımlı)

Kök hücre MSC (kemik iliği kaynaklı, CD29+/CD90+)

İskele PLGA nanofiber (200-500 nm çap, elektrospinning)

Salım profili USAGi-01 yavaş salım: ~72 saat, pH 7.4'te %80 salım

BMP desteği BMP-7 (50 ng/mL) ve Wnt3a (100 ng/mL) ile birlikte kültür

III. FONKSİYONEL EŞDEĞERLİK VE DİZİ KAPSAMI

Bu dokümanda USAG-1 geni veya proteini için verilen her bir dizi (gRNA, siRNA, shRNA, miRNA, ASO, peptid, nanobody, affimer, DARPin, antikor fragmanı), aynı hedef bölgeye bağlanan ve aynı biyolojik etkiyi (USAG-1 baskılanması) üreten tüm fonksiyonel olarak eşdeğer dizileri kapsar.

No Fonksiyonel Eşdeğerlik Kuralı

1 Hedef nükleik aside %80-100 homoloji gösteren her dizi

2 Hedef aminoasit dizisine %80-100 homoloji gösteren her peptid/protein/nanobody/affimer

3 Hedef ile 15-25 baz tamamlayıcılık paylaşan her siRNA/shRNA/miRNA/ASO

4 Aynı gen bölgesini hedefleyen farklı başlangıç/bitiş noktalı diziler

5 Verilen dizilerin uzantıları, kısaltılmış halleri, reverse complement'leri

6 Kimyasal modifikasyon içeren tüm türevler (fosforotiyoat, 2'-O-metil, LNA, PEG, lipid)

7 Farklı PAM sekansı tanıyan gRNA varyantları (NGG, NAG, NGA)

8 USAG-1'in herhangi bir domainine bağlanan tüm moleküller

Küçük moleküller için özel kapsam: USAG-1 proteininin aktif bölgesi, BMP antagonizma bölgesi veya Wnt etkileşim bölgesine bağlanan ve USAG-1 aktivitesini IC50 ≤ 50 µM ile inhibe eden her kimyasal yapı bu doküman kapsamındadır. Kimyasal yapıda ±20% atom veya fonksiyonel grup değişikliği aşikâr varyasyon kabul edilir.

IV. AŞİKÂR VARYASYON (OBVIOUSNESS) — KSR v. TELEFLEX (2007)

Parametre Aşikâr Varyasyon Kapsamı

Sayısal değerler Doz, boyut, süre, eşik değerlerinin ±20% değiştirilmesi

Taşıyıcı LNP, PLGA, lipozom, kollajen, hidrojel, AAV, lentivirus — birinin diğeriyle değiştirilmesi

CRISPR enzimi Cas9, Cas12a, Cas13, Cas14 — birinin diğeriyle değiştirilmesi

Gen susturma aracı siRNA, shRNA, miRNA, ASO — birinin diğeriyle değiştirilmesi

Hedef hücre tipi Rutin optimizasyonla değiştirilen hücre tipi (DPSC, MSC, dental folikül hücresi)

Uygulama yolu Lokal, IV, subkutan, oral jel, implantasyon — birinin diğeriyle değiştirilmesi

Peptid/nanobody dizisi Aynı hedefe bağlanan, benzer afinite gösteren alternatif dizi

Genel kural Uzman tarafından USAG-1 baskılanması için rutin optimizasyonla geliştirilebilecek her yaklaşım

V. KOMBİNATORYAL MATRİS

Parametre Seçenekler Sayı

Mekanizma 8 kategori (Gen düzenleme, RNA, küçük mol., PROTAC, peptid, epigenetik, nano, kök hücre) 8

Taşıyıcı LNP, PLGA, Lipozom, AAV, Lentivirus, Polimerik, Kollajen, Hidrojel 8

Hedefleme ligandı anti-DSPP, anti-CD146, anti-Notch1, anti-Nestin, anti-Ki67, anti-Sox2 6

Negatif seleksiyon miR-122, miR-124, anti-CD47 3

Sensör pH, ROS, ATP, IL-6, TGF-beta, BMP-7 6

Kill-switch Degron (>24-336h), doku dışı miRNA, CRISPRi 3

Parametre Seçenekler Sayı

Uygulama yolu Lokal, IV, subkutan, oral jel, implantasyon 5

TOPLAM 8 x 8 x 6 x 3 x 6 x 3 x 5 = ~691.200 konfigürasyon ~691.200

Tüm ~691.200 konfigürasyon, bu dokümandaki 8 kategorinin kombinasyonu olarak prior art kapsamındadır.

VI. KLİNİK UYGULAMA ZAMAN ÇİZELGESİ

Faz Süre Müdahale İzleme Parametresi

F0 — Tanı 1-7 gün USAG-1 seviyesi ölçümü (qPCR, kanda veya tükürükte) USAG-1 mRNA eşiği: >2x normal

F1 — Baskılama 7-28 gün siRNA/CRISPR/PROTAC (her 3 günde bir uygulama)USAG-1 protein seviyesi ≥70% düşüş (ELISA)

F2 — Rejenerasyon 28-90 gün Kök hücre + BMP-7 (50 ng/mL) + Wnt3a (100 ng/mL) desteği Diş tomurcuğu oluşumu (mikro-BT, ultrason)

F3 — Takip 90-180 gün Yeni diş izleme, gerekirse 2. doz Diş erupsiyonu, oklüzyon uyumu

Her faz arasında 7 gün washout periyodu. Döngü 1-3 kez tekrarlanabilir. F1 ve F2 aynı anda (kombine protokol) da

uygulanabilir — bu kombinasyon da prior art kapsamındadır.

VII. HUKUKİ BEYAN

Bölüm İddia Dayanak

7.1 Prior Art Statüsü Bu doküman, 21 haziran 2026 itibarıyla Zenodo ve OSF üzerinden kamuya açıklanmıştır. Bölüm II'deki 24 örnek ve tüm aşikâr varyasyonları prior art teşkil eder. 35 U.S.C. §102 / EPC Madde 54

7.2 Enablement Hedef (USAG-1 / NM_001204164), dizi bilgileri (SEQ ID NO'lar 7-8), taşıyıcı, doz, hücre tipi ve uygulama yolu somut olarak verilmiştir. [R1]-[R5] literatür kanıtları ile desteklenmiştir. Bu dokümanı okuyan bir moleküler biyolog yöntemleri uygulayabilir. 35 U.S.C. §112 / EPC Madde 83

7.3 Kapsam Dışı Japon patentindeki spesifik antikorun aynısı. USAG-1 dışında bir geni hedef alan yöntemler. Diş dışındaki dokuların rejenerasyonu. N/A

7.4 Lisans CC BY-NC-SA 4.0. Kamu hastaneleri, üniversiteler ve araştırma kurumları ticari olmayan amaçlarla kullanabilir, geliştirebilir ve aynı lisansla paylaşabilir. Ticari kullanım yasaktır. CC BY-NC-SA 4.0

VIII. SONUÇ

Bu doküman, Japon antikor patentini (US20250136674A1) alternatif tüm mekanizmalarla çevreleyen bir

prior art oluşturur. Sürüm 3.0'da eklenen başlıca güçlendirmeler:

Güçlendirme İçerik

Türkçe karakter desteği DejaVu Sans fontu ile tüm karakterler doğru gösterilmektedir

Literatür kanıtları 5 temel referans ([R1]-[R5]) ile her kategorinin biyolojik geçerliliği desteklendi

Hücre tipi netleştirildi DPSC (CD146+/Nestin+) ve MSC açıkça belirtildi

Doz-etki ilişkisi Her kategori için IC50/Kd/DC50 beklentileri ve referans analogları eklendi

Kimyasal gerekçe Küçük moleküller için sentez yolu ve referans bileşikler eklendi

Mekanizma çerçevesi USAG-1 → BMP/Wnt → Diş kaskatı Bölüm I.C'de somutlaştırıldı

Nanobody doğrulaması VHH seçim metodolojisi ve E. coli üretim protokolü eklendi

Bu dokümanda tanımlanan yöntemlerden herhangi birini içeren patent başvuruları, bu dokümanın yayın tarihi itibarıyla yenilik kriterini karşılamaz.

Muzaffer Enes Yünlü — Bağımsız Araştırmacı